

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-280297

(43)Date of publication of application : 10.12.1986

(51)Int.Cl.

C12Q 1/26
G01N 33/50

(21)Application number : 60-119782

(71)Applicant : NODA SANGYO KAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 04.06.1985

(72)Inventor : HORIUCHI TATSUO
KUROKAWA YOSHIKO

(54) QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMADORI COMPOUND AND REAGENT FOR QUANTITATIVE DETERMINATION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the quantitative determination of Amadori compound in a food or living body easily in high accuracy, by treating the specimen with fructosylamino acid oxidase in the presence of oxygen and measuring the amount of consumed oxygen or produced hydrogen oxide.

CONSTITUTION: A liquid containing Amadori compound is made to react with fructosylamino acid oxidase in the presence of oxygen at 6.5W10 pH, preferably 7.5W9 pH and $\leq 50^{\circ}$ C, preferably 37W45 $^{\circ}$ C usually for about 10W20min and the amount of oxygen consumed by the oxidization reaction or that of hydrogen peroxide produced by the oxidization reaction is measured.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-280297

⑪ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)12月10日

C 12 Q 1/26
G 01 N 33/508213-4B
E-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

⑭ 発明の名称 アマドリ化合物の定量法及びその定量用試薬

⑮ 特 願 昭60-119782

⑯ 出 願 昭60(1985)6月4日

⑰ 発 明 者 堀 内 達 雄 野田市柳沢65-1
 ⑰ 発 明 者 黒 川 淑 子 野田市桜台114の2
 ⑱ 出 願 人 財団法人 野田産業科 野田市野田399番地
 学研究所
 ⑲ 代 理 人 弁理士 小林 正雄

明 細 書

発 明 の 詳 細 な 説 明

発 明 の 名 称

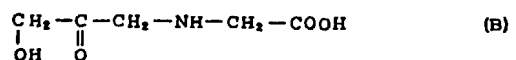
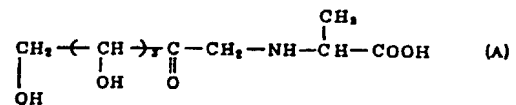
アマドリ化合物の定量法及びその定量用
試薬

特 許 請 求 の 範 囲

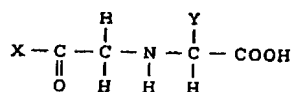
1. アマドリ化合物含有液に、酸素の存在下にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させ、酸化反応により消費される酸素量を測定するか、あるいは該反応により生成する過酸化水素を測定することを特徴とする、アマドリ化合物の定量法。
2. アマドリ化合物が、アルドースとα-アミノ酸から生成された化合物であることを特徴とする、特許請求の範囲第1項に記載の方法。
3. フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含有することを特徴とする、アマドリ化合物の定量用試薬。

本発明は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼによる新規なアマドリ化合物の定量法及びそれに用いられる定量用試薬に関する。

食品や生体内では還元性の糖、特にアルドースと呼ばれるアルデヒド基を有する糖と蛋白質、ペプチド、アミノ酸等のようにアミノ基を有する物質が共存する場合、両者が不可逆的に結合してケトアミン化合物が生成してくる。この化合物はアルデヒド基とアミノ基の結合物がアマドリ転移を起こした結果生成されることからアマドリ化合物と呼ばれている。例えばグルコースとアラニンからは次式Aのフルクトシルアラニンが生成する。またグリセルアルデヒドとグリシンからは次式Bのハイドロキシアセトニルグリシンが生成する。



このようにアルドースと α -アミノ酸が結合してアマドリ転移を起こした化合物は、その分子内に共通にイミノ2 酢酸の基本骨格を含有しており、一般的に構造は次式で表わされる。



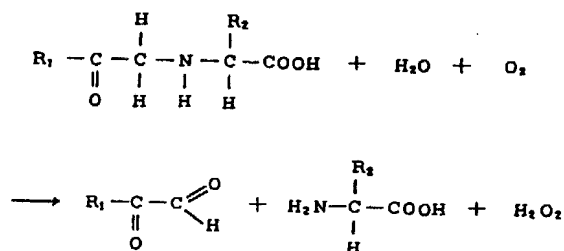
式中Xは基 $-\text{[CH(OH)]}_n-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 n は0~4の整数、Yは α -アミノ酸の側鎖残基を示す。一方アマドリ化合物はアルデヒド基を有する物質とアミノ基を有する物質が接触した瞬間から化学的にかつ不可逆的に生成蓄積されてくる。その生成速度は原料物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表わされる。それ故、その蓄積量を測定することによつて、過去の糖及びアミノ化合物の濃度、接触時間、保持温度などを推定することができるが、その定量は比較的困難であり、処理中の分解に起因する精度の低下を免れなかつた。

リ化合物の定量法を確立すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成した。

本発明はアマドリ化合物含有液に、酸素の存在下でフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作らせ、酸化反応により消費される酸素量を測定するか、あるいは該反応により生成する過酸化水素を測定することの特徴とする、アマドリ化合物の定量法である。

本発明は更に、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含有することの特徴とする、アマドリ化合物の定量用試薬である。

本発明の定量法は下記の反応を基礎としている。



従来の定量法としては例えば下記の方法が知られている。アミノ酸分析計を用いる方法(ジャーナル・アグリカルチュアル・フード・ケミストリー、24巻1号(1976)70頁参照)、アマドリ化合物を水素化ホウ素ナトリウムで還元したのち塩酸分解してカラムクロマトグラフィーで分離する方法(アチーブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(1977)181、542~549頁参照)、アマドリ化合物を弱酸と加熱して生成する5-ハイドロキシメチル-2-フルフルアルデヒドをチオバルビツール酸によつて比色定量する方法(FEBS レター(1976)71、356~360頁参照)など。しかしこれらの方法は操作の容易性及び精度の点で満足できるものでなかつた。

そこで当業界では、食品や生体中に含まれるアマドリ化合物を簡易に精度良く測定する方法の開発が特に要望されている。このような実情に鑑み、本発明者らは、迅速かつ正確なアマド

この式中、 R_1 は基 $-\text{OH}$ 、 $-\text{[CH(OH)]}_n-\text{CH}_2\text{OH}$ 又は $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ 、 n は0~4の整数、 R_2 は α -アミノ酸の側鎖残基を示す。

本発明の定量法における被検液としては、上記反応式に示されたアマドリ化合物を含有する液であればいかなるものでもよく、例えば醤油や蜂蜜のような高濃度のアミノ酸又は糖を含有するものが好適に用いられる。また生体試料などに由来する蛋白やポリペプチド鎖中に存在するものについては、温和な条件で遊離させる手段に解決すべき問題はあるが、定量の果たす効果が更に大きい。

本発明の定量に用いられるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとしては、如何なる起源のものでも使用できるが、例えば微生物、殊にコリネバクテリウム属に属する細菌から選ばれた菌を培養して得られるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いることが好ましい。コリネバクテリウム属に属する上記酵素生産菌としては、例えばコリネバクテリウム・sp. 株2-3-1〔

微工研菌寄第8245号(FERM p-8245)]
等があげられる。コリネバクテリウム・sp. 株
2-3-1は本発明者らが土壤中より分離した
新菌株であり、その菌学的性質は下記のとおり
である。

(a) 形態：顕微鏡的観察（肉汁寒天培地30℃、
1～3日間の観察）

- (1) 細胞の大きさ：0.3×0.9～0.3×1.0
ミクロンの桿菌
- (2) 細胞の多形性：わずかにわん曲した形態
を持つ、菌糸状の生育、分枝は認められ
ない。
- (3) 運動性：認められない。
- (4) 胞子の有無：認められない。
- (5) グラム染色性：陽性
- (6) 抗酸性：陰性

(b) 各培地における生育状態

- (1) 肉汁寒天平板培養：30℃、48時間の
培養で直径1.5ミリメートルの円形で表
面平滑で光沢のあるコロニーを作り、半

- (6) 硫化水素の生成：弱い陽性
- (7) 澱粉の加水分解：陰性
- (8) クエン酸の利用：コーザー及びクリステ
ンセンの両方で陽性
- (9) 無機窒素源： NH_4^+ 及び NO_3^- の両方とも
利用する。
- (10) 色素の生成：淡黄色色素を作る。
- (11) ウレアーゼ：陽性
- (12) オキシダーゼ：陰性
- (13) カタラーゼ：陽性
- (14) 生育の範囲温度：10～39℃
pH：4.2～10.0
- (15) 酸素に対する態度：好氣的
- (16) O-Fテスト：極めて弱い酸化的
- (17) 糖から酸及びガスの生成

	酸	ガス
(1) L-アラビノース	—	—
(2) D-キシロース	—	—
(3) D-グルコース	—	—
(4) D-マンノース	—	—

透明で淡黄色を帯びる。培養時間の経過
とともに不透明になつていく、拡散性の
色素は作らない。

- (2) 肉汁寒天斜面培養：生育は良好で(1)に
同じ。
- (3) 肉汁液体培地：静置培養では、生育悪く
わずかな混濁と菌の沈殿を認めるだけで
あるが振盪すると均一に良く生育する。
- (4) 肉汁ゼラチン穿刺培養：25℃、3日程で
は菌の生育はわずかに認められるが、
溶解は認められない。6日目程度になる
と菌の周囲だけわずかに液化する。
- (5) リトマスミルク：紫色になり長時間の培
養を行うと凝固せずペプトン化する。

(c) 生理的性質

- (1) 硝酸塩の還元：陰性
- (2) 脱窒反応：陰性
- (3) MRテスト：陰性
- (4) VPテスト：陰性
- (5) インドールの生成：陰性

(5) D-フラクトース	—	—
(6) D-ガラクトース	—	—
(7) 麦芽糖	—	—
(8) ショ糖	—	—
(9) 乳糖	—	—
(10) トレハロース	—	—
(11) D-ソルビット	—	—
(12) D-マンニット	—	—
(13) イノシット	—	—
(14) グリセリン	—	—
(15) 澱粉	—	—

その他セルロースの分解能は認められな
い。

前記の菌学的性質を有するコリネバクテリウ
ム・エスピー 株2-3-1の分類学上の位置につ
いて、「バージェイズ・マニユアル・オブ・デ
タミネイティブ・バクテリオロジイ」第8版（
1974年）の分類と対比検討した結果、本菌
株はグラム陽性の好氣的無胞子桿菌であり、カ

タラーゼ陽性、運動性がない、セラチン、カゼインをわずかながら分解する、糖から酸の生成を行わない、生活現にともなつて極端な細胞の多形性を示さない、セルロースを分解しないことからコリネバクテリウム属に属するものと判定される。さらに本菌株の分離源が動物質に由来しないこと、セラチンを溶解すること、ウレアーゼを生産すること、37℃で生育することから、コリネバクテリウム・ファシアンズ (*Corynebacterium fascians*) に近縁な菌株と認められるが、本菌株が土壌から分離したものであり、植物病原菌でなく、グロースファクターを必要とせず、通常培地で良く生育する点で異なっており、コリネバクテリウム属に属する新菌株の菌と判定され、本菌株をコリネバクテリウム・エスピー底2-3-1と命名した。なお、コリネバクテリウム・エスピー底2-3-1は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研菌寄第8245号 (FERM P-8245) として寄託されている。

25～37℃の範囲で、好適には30℃付近で行われる。培養開始のpHは6～8の範囲であるが、好適には6.5付近である。このような条件下で16～24時間振盪又は深部攪拌培養すれば、培養物中にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが効率良く生産され、蓄積する。

本酵素は、培養時間を長くすると菌が溶解して菌体外にも存在するようになるが、通常は菌体中に存在するので、培養物を遠心分離又は戸過して菌体を集め、適量の緩衝液に懸濁して菌体を破壊することによつて酵素を可溶化することが必要である。こうして得られた酵素含有液から、核酸、細胞壁断片等を取り除くことによつてフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを得ることができる。さらに本酵素は必要により酵素の単離精製の常法に従つて、例えば(1) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、(2) 硫酸分画、(3) フェニルセファロースカラムクロマトグラフィー、(4) セファデックス0-200カラムクロマトグラフィー等の方法、又はその他の

上記菌株を培養する培地としては、炭素源、窒素源、無機塩、その他栄養素を適宜含有していれば合成培地、天然培地いずれでも使用可能である。炭素源としては、例えばグルコース、フルクトース、キシロース、グリセリン等を用いることができる。窒素源としては、ペプトン、カゼイン消化物、大豆粉等の蛋白質又はその消化物、あるいは酵母エキスの窒素性有機物が好適に利用できる。無機物としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、マグネシウム、鉄、コバルト等の塩類が使用できる。本発明においては、フルクトシルアミノ酸含有する培地で培養したときには、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが最も収量よく得られる。該培地の好適な例としては、例えばグルコース0.3%、フルクトシルグリシン0.5%、酵母エキス0.2%、ポリペプトン0.2%、磷酸水素1カルウム0.2%、硫酸マグネシウム0.05%、塩化カルシウム0.01%、硫酸第1鉄0.01% (pH 6.5) の培地が挙げられる。培養は通常

方法を必要に応じて組み合わせて用いることにより精製酵素を得ることができる。本酵素の精製の具体例を示すと下記のとおりである。

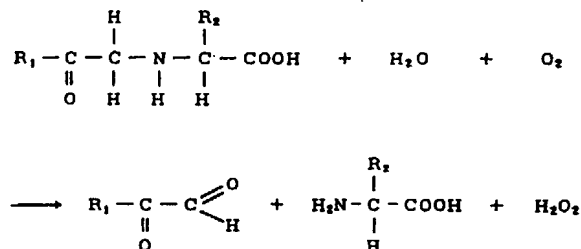
培養物中から菌体を集めたのち、0.02 M リン酸緩衝液 pH 7.5 に懸濁し、10% 量のグリセリンと1% 量のトリトン X-100 を加え溶解したのち、ダイノミル (シンマルエンタープライズ社 (スウェーデン) 製) を使用して菌体を破砕する。遠心分離して上清を集め、DEAE-セルロースカラム (0.02 M リン酸緩衝液 pH 7.5 に平衡化してある) にかけて酵素を吸着させる。食塩 0.25 M を含んだ 0.02 M リン酸緩衝液 pH 7.5 で洗浄したのち、0.5 M 食塩濃度にして酵素を溶出させる。活性画分を集め、16% になるように硫酸粉末を加える。これを16% 硫酸を含有した 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.5 に平衡化したフェニルセファロースカラムに通過させて酵素を吸着させる。この酵素を硫酸濃度で 16% → 0% の逆濃度勾配とエチレンジリコール濃度で 0 → 25% の濃度勾配をあわせ

持った0.1 M リン酸緩衝液で溶出し、その活性部について、0.1 M 食塩を含有したリン酸緩衝液 pH 7.5 で平衡化したセファデックス0-200のカラムクロマトグラフィーを行い精製酵素を得ることができる。

上記の精製手段により得られた酵素の理化学的性質は下記のとおりである。

(1) 作用及び基質特異性：

酵素の存在下で、イミノ2酢酸又はその誘導体を酸化して、グリオキシル酸又は α -ケトアルデヒド、 α -アミノ酸及び過酸化水素を生成する下記の酵素反応を触媒する酵素である。



この式中、 R_1 は基 $-\text{OH}$ 、 $-(\text{CH}(\text{OH}))_n-\text{CH}_2\text{OH}$ 又は $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ 、 n は0~4の整数、 R_2 は α -アミノ酸の側鎖残基を示す。

なお、本酵素は β -アミノ酸例えば β -アラニン等、イミノ酸例えばプロリン等、メチルアミン、エタノールアミン等のアマドリ化合物に対しては作用しない。またケトン還元したも

の例えばグルシトリルグリシン等にも作用しない。

(2) 至適 pH：

本酵素の至適 pH は、フルクトシルグリシンを基質とした場合、第1図に示すごとく pH 8.0~8.5 である。測定は酵素の吸収速度をオキシゲンモニターで計測することにより行つた。なお図中の使用緩衝液は下記のとおりである。

- ：0.1 M リン酸カリウム緩衝液
- ×—×：0.1 M ベロナール塩酸緩衝液
- △—△：0.1 M グリシン—NaOH 緩衝液

(3) pH 安定性：

本酵素0.1単位を含有する各種緩衝液0.2 ml を40℃、10分間加熱し、残存した酵素活性を調べた。その結果は第4図に示すとおりである。なお図中の使用緩衝液は下記のとおりである。

- ：0.1 M リン酸カリウム緩衝液
- △—△：0.1 M リン酸ナトリウム—0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液
- ×—×：0.1 M グリシン—NaOH 緩衝液

(4) 力価の測定法：

第1法：生成される過酸化水素を発色定量する方法

0.05% 4-アミノアンチピリン及び0.015% 2,4-ジクロロフェノールサルホネートを含有する0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 2.8 ml を試験管にとり、400 U/ml のパーオキシダーゼ溶液1.0 μ l を加える。温度平衡を37℃に達せしめたのち、適当な活性を有する酵素溶液0.1 ml を加え、さらに0.5 M フルクトシルグリシン—0.1 ml を加えて10分間反応させ、生じた色素を光電比色計を用いて510 nm における吸光度を測定する。別にあらかじめ過酸化水素の標準溶液を用いて、その生成色素量との関係を調べたグラフを用意する。このグラフを用いて、37℃、1分間当りに生成される過酸化水素のマイクロモルを計算し、この数字を使用酵素液中の活性単位とする。

第2法：酵素反応にともなつて吸収される酸素量を測定する方法

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 2.9 ml を YSI 社製オキシゲンモニターの測定容器にとり、0.5 M フルクトシルグリシン 0.1 ml を加え、37℃ で 10 分間攪拌し、溶存酸素と温度を平衡に達せしめる。これに酸素電極を差し込み、密閉したのち、酵素溶液 50 μ l を注入し、生じる酸素吸収をモニターに接続した記録計で連続的に計測し、その最初の速度を測定する。あらかじめ同様にして容器内の酸素濃度と記録値の間で標準曲線を作成し、これを用いて測定値から酸素濃度を求める。37℃、1 分間当たり 1 マイクロモルの酸素吸収を起こす酵素の活性を 1 単位とする。

(5) 作用適温の範囲：

フルクトシルグリシンを基質にして、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、酵素反応により生成するグリシンを液体クロマトグラフィーで分離定量する方法によつて測定した。その結果は第 2 図に示すとおりで、本酵素の作用適温の範囲は 35 ~ 45℃ である。

用いたカラムゲル透過法で測定した結果、0.1 M 食塩含有 0.05 M リン酸緩衝液中では 65000 であつた。

(10) 等電点：

ディスク焦点電気泳動法により測定した結果、 $PI = 4.6$ であつた。

(11) ディスク電気泳動：

デービスの pH 9.4 のゲルを用いて 3 mA/ゲルで 5℃、80 分泳動を行い、酵素蛋白をクマジーブリリアントブルー G-250 で染色した。その結果、ゲルのアクリルアミド濃度 7.5% の時は陽極側に 4.1 cm (ブロムフェノールブルーは 4.5 cm)、15% の時には同じく陽極側に 1.7 cm の所に酵素活性を持つ単一なバンドを認めた。

以上のように本酵素は、その作用及び基質特性において従来全く知られていない新規な酵素である。

上記のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをアマドリ化合物の含有液に作用させる場合には、pH 6.5 ~ 10 及び温度 50℃ 以下、好ましく

(6) 熱安定性：

精製酵素 0.1 単位を含有する酵素液 0.5 ml (0.1 M リン酸緩衝液、pH 8.0) を各温度で 10 分間放置したのち、残存した酵素活性を調べた。その結果は第 3 図に示すとおりで、35℃ 以下では安定であるが、45℃ で 90% が失活する。

(7) 阻害活性化及び安定化：

0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、酸素吸収を測定することによつて調べた。濃度 2 mM の各物質の本酵素に対する影響は、下記のとおりである。 Hg^{++} 、 Pb^{++} 、SDS は強く阻害し、 Ni^{++} 、 Zn^{++} は中程度に阻害する。各種キレーター及び SH 試薬は微弱な阻害しか与えなかつた。また本酵素に対する活性化剤及び安定化剤については未知である。

(8) 精製方法：

本酵素は前記の精製方法によつて精製することができる。

(9) 分子量：

本酵素の分子量は、セファデックス G-200 を

は pH 7.5 ~ 9 及び温度 37 ~ 45℃ の条件で、通常は 10 ~ 20 分間程度反応させる。pH の調整には、前記反応の pH 範囲を維持することができ、かつ酵素反応を阻害しない任意の緩衝液が用いられ、例えばリン酸カリウム緩衝液、ベロナール緩衝液、リン酸カリウム-炭酸ソーダ緩衝液、クエン酸-リン酸ソーダ緩衝液等が好ましい。フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの使用量は、通常は 0.5 単位/ml 以上である。

本発明においては、下記の何れかの測定法によりアマドリ化合物を定量する。

(1) 酵素反応により生成する過酸化水素の測定法：

反応により生成する過酸化水素を、過酸化水素定量の常法に従つて、例えば発色方法、過酸化水素電極を用いる方法等により定量し、あらかじめ別に用意した過酸化水素量とアマドリ化合物量との標準曲線よりアマドリ化合物を定量する。なお発色法により過酸化水素を測定する場合には、例えば前記の「力価の測定法」に記載した測定法と同様に操作する。

(2) 酸素消費に基づく定量法:

この定量法は、反応開始時の酸素量より反応終了時の酸素量を差引いた値(酸素消費量)を、測定し、あらかじめ別に用意した酸素消費量とアマドリ化合物量との標準曲線よりアマドリ化合物含有量を定量するもので、酸素量の測定は常法に従つて、例えばワールブルグ検圧法、酸素電極法等により行われる。なお酸素電極法により酸素消費量を測定する場合には、例えば前記の「力価の測定法」に記載した測定法と同様に操作する。

本発明のアマドリ化合物定量用試薬は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及び酵素作用を行わしめるに好適な pH 範囲、一般に pH 6.5 ~ 10 好ましくは pH 7.5 ~ 9 を与える緩衝剤、更に反応生成物を測定する場合には、必要により発色剤等を適宜組合せて成る。

フルクトシルアミノ酸オキシダーゼとしては、液状、粉末状の何れでもよく、1検体当りの酵素量は通常は 0.5 単位/ml 以上である。緩衝剤

ペプチド鎖に結合したものも、適当なペプチダーゼを作用させ、遊離状態にしたのちには同様に測定することができ、特に糖尿病の病態測定に利用できる。

実施例 1

4-アミノアンチピリン 0.5 %	0.3 ml
2,4-ジクロロフェノールサルホネート 0.15 %	0.3 ml
リン酸緩衝液 0.2 M、pH 8.0	1.5 ml
パーオキシダーゼ 400 単位/ml	10 μ B
フルクトシルバリン 1.5 mM	0 ~ 100 μ B

蒸留水を加えて全量を 2.95 ml に調整した。

上記反応液の入った試験管にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(198 単位/ml 含有) 50 μ B づつを加えて、37℃にて10分間反応させたのち、発色した色素を 510 nm で比色定量した。その結果、加えたフルクトシルバリンと吸光度の間に比例関係が認められた。

実施例 2

オキシゲンモニター(米国 YSI 社製)の酸素測定容器に 0.2 M リン酸カリウム緩衝液(pH

としては、例えばリン酸カリウム緩衝液、ベロナール緩衝液、リン酸カリウム-炭酸ソーダ緩衝液、クエン酸-リン酸ソーダ緩衝液等が好ましい。反応生成物を測定する際の発色剤としては、該生成物と反応して発色する物質が用いられ、過酸化水素の発色剤としては、パーオキシダーゼと例えば 4-アミノアンチピリン/N,N-ジエチルアミン、4-アミノアンチピリン/フェノール、4-アミノアンチピリン/N,N-ジメチルアニリン、ABTS、MBTH/N,N-ジメチルアニリン、4-アミノアンチピリン/2,4-ジクロロフェノールサルホネート等の組合せがあげられる。本発明のアマドリ化合物定量用試薬は冷暗所、特に 5℃以下に保存することが好ましい。

本発明によれば、従来困難であつたアマドリ化合物の測定が容易になり醤油等の食品や輸液等の製造時及び保存中の状態を反映するアマドリ化合物を効率良く測定することができる。また、尿や血液及び生体に由来する蛋白質やポリ

7.2) を 1.5 ml とり、カタラーゼ(50000 単位/ml) 10 μ B、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(198 単位/ml 含有) 50 μ B 及び蒸留水 1.25 ml を加えて 37℃で 10 分間攪拌を続けて平衡に達せしめた。酸素電極をさしこんで密閉したのち、醤油溶液(pH 7.0 に調整後水で 2 倍に希釈したもの) 20 μ B を加えて反応させた。反応経過はモニターに接続した記録計ですべて記録し、20 分後に反応結果を測定したところ、反応前から 1.8 目盛の酸素濃度の変化が読みとれた。同様にしてフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの代りに水を用いて操作した場合には、1.2 目盛の変化が読みとれた。その差は 0.6 目盛であつた。醤油溶液の代りにフルクトシルグリシンの標準液を用いて同様に操作して得た検量線から、この値は 0.26 μ モルと算出された。

実施例 3

4-アミノアンチピリン 6 mg、0.2 M リン酸カリウム水溶液 3.2 ml 及び 0.2 M 炭酸ナトリウ

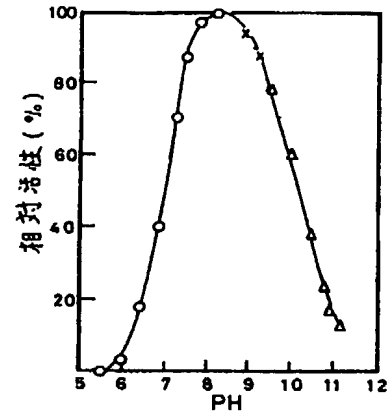
ム水溶液 2.8 ml を混合して分析用キャット(A)とした。また添付液として 0.1 % 2,4-ジクロロフェノールサルホネート水溶液(B) 1.8 ml 並びにフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ 300 単位及びパーオキシダーゼ 132 単位を含有する 60 % グリセリン液(C) 5 ml を調製した。使用に際しては 3 者を混合して蒸留水を加え全量 100 ml とした。試料溶液 0.5 ml に対し試薬溶液 2.5 ml を使用する。

図面の簡単な説明

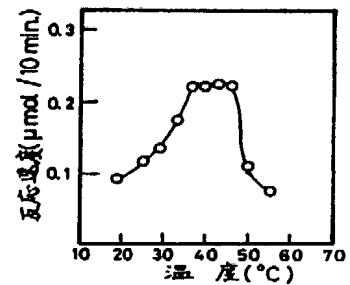
第 1 図は本発明に用いられる酵素の一例についての至適 pH を示すグラフ、第 2 図は至適温度を示すグラフ、第 3 図は各温度における失活を示すグラフ、第 4 図は各 pH における失活を示すグラフである。

出願人 財団法人 野田産業科学研究所
代理人 弁理士 小林 正雄

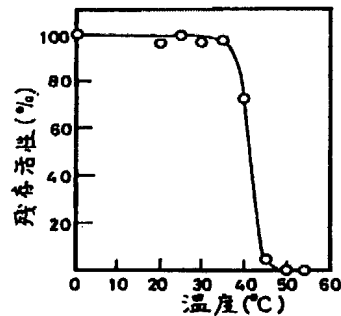
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

